

Debreceni Orvostudományi Egyetem, Fül-orr-gégeklinika

(igazgató: Lampé István dr. egyetemi tanár)

III. sz. Belgyógyászati Klinika

(igazgató: Szegedi Gyula dr. egyetemi tanár)

Leukocyta letapadás gátlás (LAI)* teszt alkalmazása gégecarcinomás betegeken

JÓKAY ISTVÁN dr.*, BOROS PÉTER dr., TÓTH LÁSZLÓ dr., LAMPÉ ISTVÁN dr.,
SZEDEDI GYULA dr.

Közlésre érkezett 1985. március 8-án.

A szerzők 20 gégecarcinomás beteg esetében vizsgálták a specifikus tumor antigén elleni immunitást LAI teszt segítségével. A módszer lényege, hogy specifikus tumor antigén jelenlétében a gégecarcinomás betegek perifériás leukocitáinak adherenciája – kapillaris cső falára – gátolt. A betegeket 6 csoportba osztották és összehasonlították a LAI aktivitás eredményeit. A kezelés előtt álló gégecarcinomás betegeknél és a műtéten átesett, de recidívát mutató betegeknél szignifikáns eltérést találtak a LAI teszt során. Az eredmények alapján érdemesnek tartják a módszer felhasználását tumoros betegek prognózisának becslésére.

A tumor immunológiai kutatások fejlődése alapján egyre inkább realinak tűnik az az igény, hogy a szervezet immunológiai válaszkészségéből tudjunk következtetni a tumoros beteg prognózisára. Bár évtizedek óta a kutatások tárgya a tumoros beteg immunrendszere, mégis jelenleg a mindennapi gyakorlatban prognosztikus következtetéseket csak a tumor szövettani típusából, méretéből és elhelyezkedéséből kívánnak levonni. Ezzel szemben számos intézetben az immunológiai statuszt vizsgálva törekszenek a tumoros beteg prognózisának becslésére.

A betegek immunológiai monitorozására többféle lehetőség van. A morfológiai vizsgálatok (az egyes limfocita subpopulációk arányainak meghatározása monoklonális technikákkal) mellett a különböző limfocita reaktivitási vizsgálatok (antigén felismerési tesztek, blaszt transzformáció, bőrpróbák) állnak rendelkezésre.

Általában elfogadott, hogy a beteg T sejtjeinek reaktivitása egyenes arányban van a jobb prognózissal [1]. A cellularis immunológiai jelenségek vizsgálatára használt in vitro módszerek közül viszonylagos egyszerűsége, munka és eszközigényessége ellenére a Halliday és mtsai által [2] 1972-ben közölt leukocita letapadás gátlási teszt (LAI) terjedt el. A módszer lényege, hogy a humán perifériás vér leukocitáinak adherenciája – a kapillaris cső falára – specifikus antigén jelenlétében gátolt. Tumor antigént tartalmazó szövet kivonat alkalmazása esetén a létrejövő adherencia gátlás a leukociták felületén, tumor felismerésére utal. A LAI tesztet sikeresen alkalmazták a gastrointesztinalis traktus malignus betegségei [3], az urogenitalis traktus malignus betegségei [4], a tüdő [5], a pajzsmirigy [6] rosszindulatú betegségei, neuroblasztomás beteg [7] és melanomás betegség eseteiben is. [8]. A közleményekben az esetszám 20–60 között volt. Jelen vizsgálatunkban különböző stádiumban lévő, gégecarcinomás betegek esetében használtuk

* Leukocyte Adherence Inhibition

* 4012. Debrecen, Fül-orr-gégeklinika

a LAI tesztet, akik szövettanilag carcinoma planocelulare keratoides, ill. non keratoides típusba tartoztak. Vizsgáltuk a tumorspecifikus antigén felismerési képességét. Szeretnénk arra választ kapni, hogy alkalmazható-e a gégetumoros betegek prognosztikájában a tumor felismerő képesség megléte, elvesztése, ill. ismételt megjelenése.

Betegek

Vizsgálatainkban 22 beteg szerepelt. Ezek közül 2 precarcinomás leukoplakiás beteg, míg 20 szövettanilag igazolt gégecarcinómában szenvedett. A betegek mindannyian férfiak voltak, koruk 39–80 év között volt. A betegeket 6 csoportba osztottuk. Az első csoportba a precancerózus stádiumba tartozó betegek voltak. A második csoportba a műtét előtt álló, operabilis carcinomás betegek kerültek. A harmadik csoportban a total gégekiirtáson átesett, de jelenleg klinikailag tumormentes betegek szerepeltek. A negyedik csoportban szintén total gégekiirtáson átesett, de recidívát mutató betegek szerepeltek. Az ötödik csoportot előrehaladott, inoperabilis stádiumban lévő betegek alkotják. Végül kontrollként egészséges egyének szerepeltek.

Módszer

Antigén: Human gégetumorból állítottuk elő az antigént, *Reishfeld* és *mtsai* [9] módszerével, a tumor szövettanilag carcinoma planocelulare non keratoides volt. A módszer lényege 3 M-os KCl-al történő extrahálás. A bakteriális szennyeződés kizárására sorozat tenyésztéseket végeztünk. A vizsgálatokhoz felhasznált antigén mennyisége 120 gamma/ml volt, fehérje tartalomra vonatkoztatva. Minden vizsgálathoz ugyanazt az antigént használtuk. A meghatározás Biuret módszerrel történt.

Sejtek: 20 ml perifériás vért alvadásában citráttal gátoltunk (3,3%-os Na-citrat 1/5 mennyiségben), 3%-os zselatin oldattal 1:3 arányban összekeverve 45 percig ülepítettük. A sejtűs felülszót centrifugáltuk (1000 ford./5 percig) és 1 ml. desztillált vízzel 20°-ig kezeltük. Ezután 0,1 rész citrátot tartalmazó Parker 199-es tápfolyadékkal 15-szörösére hígítottuk, és a hígító folyadékkal 2-szer mostuk a sejteket. A végső leukocita suspensió töménységét citrátmentes Parker 199-el 6×10^6 -on sejt/ml-re állítottuk be. Az eddig leírt műveletekhez szilikonozott eszközöket használtunk. A sejtszeparálás 37°-on történt. A fehérvérsejt életképességét tripan-kék felvétellel ellenőriztük, ez minden esetben 85% felett volt.

LAI-teszt: Szilikonozott porampullákban történt a sejtek és az antigén előinkubálása (1/2 óráig 37°C-on 5%-os CO₂-t tartalmazó környezetben). Kontrollként a 0,25 ml-es sejtszuszpenziót és 0,25 ml tápfolyadékot tartalmazó minta szerepelt. A végső térfogat valamennyi mintában állandó, 0,50 ml volt. Az előinkubálás után minden mintából 4 kapillariszt töltöttünk meg (75 mm-es, mosott, hőléggel sterilizált hematokrit kapillaris cső), a csövek egyik végét gittel zártuk. Az azonnali letapadás lemerésére kettő kapillaris tartalmát azonnal mérőfolyadékba (5 ml fiziológiás konyhasó oldat, benne 2 csepp 2%-os szaponin) mostuk, a többi kapillariszt termosztátba helyeztük 1 órára, vízszintes felületre. Az egy órás inkubálás után ezek tartalmát is mérőfolyadékba mostuk. A mérés Picoscale részecske számláló műszerrel történt (PA-4, Medicor, Budapest). A kapott adatokat *Urist* és *mtsai* [10] nyomán értékeltük:

A letapadt sejtek %-os aránya =
$$\frac{\text{inkubáció nélkül} \quad \text{inkubáció után}}{\text{nem adherens sejtek átlaga inkubáció nélkül}} \times 100$$

szignifikánsan bizonyította az antigen felismerést. A kísérletek eredménye alapján a planocellularis gége tumorban szenvedő betegek szövettani diagnózis után lévő, de terápia előtt álló csoportja felismerte az antigent, a LAI-teszt szignifikánsan pozitív volt. Az operált, klinikailag tumormentes csoportban nincs antigen felismerés, jelezve a betegek tumormentességét. Az operációt követő és recidívát mutató csoportban ismételtelen megjelent az antigen felismerés. A kapott eredmények egyeznek *Holan* és *mtsai* [15] által közölt adatokkal, miszerint a gégecarcinomás betegeknél a kezdetben kimutatható LAI pozitivitás operáció után megszűnik, majd a műtétet követően, ha recidiva jön létre, újra megjelenik. A szövettanilag és klinikailag precancerosus stádiumban lévő betegeknél specifikus tumor antigen hiányában várható a LAI-teszt negatív eredménye.

Az inoperábilis csoportba tartozó betegek LAI negativitása meglepőnek tűnik. A nagy tömegű tumor antigen jelenlétében a LAI teszt során egyértelműen nagy antigen felismerést, LAI pozitivitást várnánk. A várakozással ellentétes negatív eredményt vagy az e betegcsoportnál alkalmazott Cobalt irradiációs terápia immun rendszert depresszív hatásának [16], vagy az ún. „Blocking” faktorok jelenlétének [17] tudható be. A LAI-teszt alkalmazása során nyert eredményeink – az irodalmi adatokkal összehasonlítva – feljogosítanak annak feltételezésére, hogy a klinikai immunológiai kísérletek tovább folytatásával az immunstatus monitorozását kibővítve, – megbízható prognózist készíthetünk tumoros betegeink számára.

IRODALOM: 1. *Krause, C. J.* and *Nysather, J. O.*: Current Concepts of Tumor Immunology. II. Tumor Immunodetection. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 86:871–874, (1977). – 2. *Halliday, W. J.* and *Miller, S.*: Leukocyte Adherence Inhibition: A Simple Test for Cellmediated Tumour Immunity and Serum Blocking Factors. *Intern. J. Cancer* 9:477–483, (1972). – 3. *Rutherford, J. C., Walters, B. A. J., Cavaye, G.,* and *Halliday, W. J.*: A Modified Leukocyte Adherence Inhibition Test in the Laboratory Investigation of Gastrointestinal Cancer. *Intern. J. Cancer*, 19:43–48, (1977). – 4. *Ablin, R. J., Bhatti, R. A., Brunz, G. R.,* and *Guinan, P. D.*: Leukocyte Adherence Inhibition and Immunoreactivity in Prostatic Cancer. I. Identification of Anti-Tumour Cellmediated Immunity and „Blocking” factor. *European J. Cancer*, 13:699–703, (1977). – 5. *Boros P., Juhász I., Szabó G., Szegedi Gy.*: Leukocytá letapadás gátlás (LAI) test hörgőrákos betegeken. *Pneumonológia Hungarica* 33:215–220, (1980). – 6. *Boros P., Balázs Gy., Csáky G., Sonkoly I.*: Pajzsmirigyrákos betegek cellularis immunválaszának vizsgálata leukocytá letapadás és leukocytá migrációs teszt párhuzamos alkalmazásával. *Magyar Onkológia* 25:253–259, (1981). – 7. *Lampert, F.,* and *Dietmaier, E.*: Leukozyten-Adhärenz-Inhibition: Ein einfacher in-vitro Test zum Nachweis Tumorspezifischer Immunität und blockierender Serumfaktoren bei Kindern mit Malignomen. *Infection*, 1:17–23, (1973). – 8. *Halliday, W. J., Malvish, A. E., Little, J. H.,* and *Davis, N. C.*: Leukocyte Adherence Inhibition and Specific Immunoreactivity in Malignant Melanoma. *Intern. J. Cancer*, 16:645–658, (1975). – 9. *Reisfeld, R. A., Pellegrino, M. A., Kahan, B. D.*: Salt Extraction of Soluble HLA Antigens. *Science* 172:1132–1134, (1971). – 10. *Urist, M. M., Boddie, A. W., Holmes, E. C.,* and *Morton, D. L.*: Capillary Tube Leukocyte Adherence Inhibition: An Assay for Cell-mediated Immunity in Cancer Patients. *Intern. J. Cancer*, 17:338–341, (1976). – 11. *Flores, M., Marti, J. H., Grosser, N., MacFarlane, J. K.,* and *Thomson, D. M. P.*: An Overview: Antitumour Immunity in Breast Cancer Assayed by Tube Leukocyte Adherence Inhibition. *Cancer*, 39:494–505, (1977). – 12. *Sipos, J., Gábor, V.* and *Tóth, Z.*: Inhibition of Leukocyte Migration by Tumour Associated Antigen and its Modification by Serum: *IgA as a Blocking Factor.* *Neoplasma*, 25:181–188, (1978). – 13. *Marti, J. H.,* and *Thomson, D. M. P.*: Anti-Tumour Immunity in Malignant Melanoma. Assay by Tube Leukocyte Adherence Inhibition. *Brit. J. Cancer*, 34:116–134, (1976). – 14. *Grosser, N.,* and *Thomson, D. M. P.*: Cell-mediated Antitumor Immunity in Breast Cancer Patients Evaluated by Antigeninduced Leukocyte Adherence inhibition in Test Tubes. *Cancer Res.* 35:2571–2579, (1975). – 15. *Holan, V., Sibl, O.,* and *Hasek, M.*: Monitoring of Antitumor Immunity in Patients with Larynx Cancer by Tube

Leukocyte Adherence Inhibition Assay. Cancer Res. 39:651-653, (1979). — 16. Papanhausen, P. R., et al: Cellular Immunity in Patients with Epidermoid Cancer of the Head and Neck. Laryngoscope, 89:538-549, (1979). — 17. Hellström, I., Sjögren, H. O., Warner, G. A. et al: Blocking of Cell-Mediated Tumor Immunity by Sera from Patients with Growing Neoplasms. Int. J. Cancer, 7:226-337, (1971).

И., Йокан, П., Борош, Л., Тот, И., Лампе, Дь.; Сегеди: *Применение теста ингибирования лейкоцитов (LAI) у больных с карциномой гортани*
У 20 больных карциномой гортани авторы исследовали иммунитет против специфического опухолевого антигена с помощью теста LAI. Суть метода в том, что, в присутствии специфического опухолевого антигена, адгезентность периферических лейкоцитов больных с карциномой гортани ингибирована (прилипание к стенке сосуда). Больных разделили на 6 групп и сравнили результаты активности LAI. С помощью теста LAI обнаружили достоверные отклонения у больных с карциномой горла перед операцией, и у больных, перенесших операцию, но с признаками рецидива. На основании полученных результатов, авторы считают, что этим методом стоит пользоваться для оценки прогноза больных с опухолями.

I. Jókay, P. Boros, L. Tóth, I. Lampé, Gy. Szegedi: *Applying the leukocytic adherence inhibition (LAI) test in patients with laryngeal cancer*

The authors studied the immunity against specific tumour antigens with the LAI-test on 20 patients suffering from laryngeal cancer. The essence of the method is, that in presence of specific tumour antigens, the adherence — to the wall of the capillary pipe — of peripheral leukocytes is inhibited in patients suffering from laryngeal cancer. They assigned the patients into 6 groups and, made a comparison between the effects of LAI-activity. The authors found a significant difference in the LAI-test between patients being before treatment and, between operated patients, who got a recurrence of laryngeal cancer. According to the results the authors consider this method as well, in application of the prognosis-valuation of cancerous patients.

I. Jókay, P. Boros, L. Tóth, I. Lampé, Gy. Szegedi: *Die Anwendung des Leukozyten-Adhaerenz-Hemmungs-Test (LAI) bei Patienten mit Kehlkopfkarzinom*

Verf. untersuchten bei 20 Patienten mit Kehlkopfkarzinom die Immunität auf spezifisches Tumorantigen mit Hilfe des LAI-Tests. Bei Vorhandensein des spezifischen Tumorantigens ist bei Tumorpatienten die Adhaerenz der peripheren Leukozyten an der Wand des Kapillarröhrchens gehemmt. Die Patienten wurden in 6 Gruppen aufgeteilt und die Ergebnisse der LAI-Aktivität verglichen. Bei Patienten vor der Behandlung und bei operierten Patienten mit Rezidiv wies der LAI-Test signifikante Abweichung auf. Aufgrund dieser Erfahrung lohnt sich nach Auffassung der Verf. die Verwendung des Tests zum Abschätzen der Prognose der Tumorpatienten.

HALÁLOZÁS

Dr. Bollabás Béla ny. ov. főorvos, az orvostudományok kandidátusa 1986. januárban elhunyt. Emlékét kegyelettel őrizzük.